



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월06일
 (11) 등록번호 10-1682697
 (24) 등록일자 2016년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/40 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2013-0131628
 (22) 출원일자 2013년10월31일
 심사청구일자 2014년10월31일
 (65) 공개번호 10-2015-0050778
 (43) 공개일자 2015년05월11일
 (56) 선행기술조사문헌
 VAIDYA, HITESH B. et al., 'Glycogen Phosphorylase-a is a common target for Anti-Diabetic effect of Iridoid and Secoiridoid Glycosides', J. Pharm. Pharm. Sci. Vol.16, No.4, pp.530-540, 2013(2013.09.09.*
 US20120328720 A1
 CN102911222 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 한국 한의학 연구원
 대전광역시 유성구 유성대로 1672 (전민동)
 (72) 발명자
 김진숙
 서울 관악구 남부순환로230길 93, 804호 (봉천동, 반석블레스빌)
 김정현
 서울 영등포구 선유서로28길 17, (양평동1가) (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 손민

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 신창훈

(54) 발명의 명칭 **식나무 추출물을 포함하는 당뇨병병증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨병병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 당뇨병병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 당뇨병병증을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



정상군 고혈당 처리군 약재 처리군

(72) 발명자

김영숙

대전 유성구 대덕대로568번길 13, (도룡동)

정승현

대전 유성구 문화원로6번길 31, 402호 (장대동, 푸른솔빌라)

김찬식

대전광역시 대덕구 대덕대로 1555 110동 2003호 (석봉동, 금강엑슬루타워)

정동호

대전 동구 갯이4길 56, (가양동)

이윤미

대전 중구 계룡로 852, 24동 1501호 (오류동, 삼성아파트)

이익수

대전 대덕구 계족로663번길 27, 129동 305호 (법동, 주공1단지아파트)

이유리

대전 유성구 신성남로95번길 13, 303호 (신성동)

최소진

대전 유성구 전민로26번길 38, 씨티하우스 201호 (전민동)

편보정

대전 유성구 유성대로1679번길 18-6, 203호 (전민동)

김주환

경기 성남시 분당구 황새울로 196, 퍼스티플러스 315호 (수내동)

명세서

청구범위

청구항 1

식나무(*Aucuba japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 족부궤양 및 당뇨병 심장병으로 이루어진 군으로부터 선택된 당뇨합병증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식나무 추출물은 식나무의 가지, 잎 또는 뿌리를 추출한 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 얻은 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추출은, 상온 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 증기 추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 식나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의 생성을 억제함으로써 당뇨합병증을 예방 또는 치료하는 것인 약학적 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항의 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 것을 포함하는, 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 족부궤양 및 당뇨병 심장병으로 이루어진 군으로부터 선택된 당뇨합병증을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 8

식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 족부궤양 및 당뇨병 심장병으로 이루어진 군으로부터 선택된 당뇨합병증 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식나무 추출물은 식나무의 가지, 잎 또는 뿌리를 추출한 것인 식품 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출하여 얻은 것인 식품 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 추출은, 상온 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 초음파 추출 및 증기 추출로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 식품 조성물.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 식나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의 생성을 억제함으로써 당뇨합병증을 예방 또는 개선하는 것인 식품 조성물.

청구항 13

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 함유하는 당뇨합병증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 당뇨합병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용하여 당뇨합병증을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 전 세계적으로 중요한 성인병 중의 하나로서, 최근 우리나라에서도 급속한 경제 성장과 더불어 당뇨병 유병률이 10%에 달하며, 현재 전 세계적으로 2억4천만명이 넘었으며, 2025년에는 전 세계적으로 3억8천만명으로 증가할 것이며, 이중 60%가 아시아 지역에서 발병할 것이라고 2009년 미국의사협회(JAMA)에서 발표하였다. 특히 당뇨발병시기가 중장년으로 당겨졌으며, 또한 수명이 연장됨으로 인해서 합병증으로 진전되는 것을 피할 수 없는 상황이 되었다. 즉, 일반적으로 당뇨병에 걸린 후 10 ~ 20년이 지나면 체내 거의 모든 기관이 손상을 받아 당뇨성 망막병증(diabetic retinopathy), 당뇨성 백내장(diabetic cataract), 당뇨성 신증(diabetic nephropathy), 당뇨성 신경병증(diabetic neuropathy), 심장병, 암, 골다공증 등으로 나타난다. 만성 당뇨성 신증은 혈액 투석 치료 및 말기 신부전의 가장 중요한 원인이 되고 있으며, 당뇨성 백내장과 망막증은 실명을 초래하고 결국엔 죽음에 이르게 한다.

[0003] 미국의 경우 25세에서 74세 연령대의 실명의 원인이 당뇨병이며, 당뇨 발병 후 15년이나 20년이 지나면 60%가 실명으로 이어진다. 그러므로 당뇨환자에게서 합병증이 발병하는 기간이 5년이나 10년 정도 지연만 되더라도 환자나 그 가족의 삶의 질이 달라질 것이며, 국가재정에도 커다란 영향을 끼칠 것이다.

[0004] 이러한 당뇨합병증을 유발하는 대표적인 인자 중의 하나로 크게 단백질의 비효소적 당화반응(nonenzymatic

glycation of proein) 및 폴리올 경로(polyol pathway) 등이 설명되고 있다.

- [0005] 단백질의 비효소적 당화반응(nonenzymatic glycation of protein)이란, 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당이 효소 작용 없이 축합반응, 즉 밀리아드 반응을 수행하는 것으로, 이 반응의 결과로 최종당화산물(advanced glycation endproducts, AGEs)이 생성된다. 단백질의 비효소적 당화반응은 (1) 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당의 알데히드 또는 케톤이 효소 작용 없이 친핵성 첨가 반응을 하여 초기 단계 산물인 슈프염기(schiff base)를 형성하고, 상기 슈프염기와 인접한 케토아민 어닥트(ketoamine adduct)가 서로 축합하여 가역적인 아마도리(Amadori)형의 조기당화산물이 생성되는 단계와 (2) 고혈당 상태가 지속되어 가역적인 아마도리형의 조기당화산물이 분해되지 않고 재배열(rearrangement)되어 비가역산물인 최종당화산물이 생성되고 이렇게 생성된 최종당화산물이 단백질 또는 지질 등과 결합 또는 교차결합(cross-linking)되어 비가역적인 당화 단백질 또는 당화지질 등의 산물이 생성되는 단계로 나눌 수 있다.
- [0006] 가역적인 아마도리형의 조기당화산물과 달리 최종당화산물은 비가역적인 반응 산물이므로, 일단 생성되면 혈당이 정상으로 회복되어도 분해되지 않고, 최종당화산물이 결합한 단백질 또는 지질의 생존기간 동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 조직 곳곳에서 합병증을 유발시킨다(Vinson, J. A. et al., 1996, *J. Nutritinal Biochemistry* 7: 559-663; Smith, P. R. et al., 1992, *Eur. J. Biochem.*, 210: 729-739).
- [0007] 예를 들면, 포도당과 여러 종류의 단백질이 반응하여 생성된 최종당화산물 중 하나인 당화 알부민은 만성 당뇨병 신증을 일으키는 중요한 요인으로 작용한다. 당화 알부민은 당화가 진행되지 않은 정상 알부민에 비해 더 용이하게 신사구체 세포 내로 유입되고, 고농도의 포도당은 메산지움 세포를 자극하여 세포의 기질(extracellular matrix) 합성을 증가시킨다. 과도하게 유입된 당화 알부민과 증가된 세포외 기질로 인하여 신사구체의 섬유화가 야기된다. 이와 같은 기전으로 신사구체가 계속 손상 받게 되어 혈액투석 또는 장기이식 등의 극단적인 치료방법을 쓸 수밖에 없는 단계에 이르게 되는 것이다. 또한, 만성 당뇨병으로 인하여 동맥벽에서는 콜라겐이, 신사구체에서는 기저막성 단백질이 최종당화산물과 결합되어 조직에 축적됨이 보고된바 있다(Brownlee, M., et al., 1986, *Sciences*, 232, 1629-1632).
- [0008] 이처럼 비효소적 단백질 당화반응에 의하여 기저막, 혈장 알부민, 수정체 단백질, 피브린, 콜라겐 등의 단백질에서 당화가 일어나며, 생성된 최종당화산물이 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 족부궤양, 혈관질환 등의 만성 당뇨병병증을 유발시킨다.
- [0009] 또한, 최종당화산물이 사람의 미세혈관 내피세포에서 폴리올 경로의 주효소인 알도스 환원효소(AR)를 활성화시키는 것이 보고된바 있다(Nakamura, N., et al., 2000, *Free Radic Biol. Med.*, 29: 17-25). 이때 과당은 포도당에 비하여 단백질의 비효소적 당화반응의 속도가 약 10배 정도 빠르다. 따라서, 고농도의 과당이 단백질과 결합하여 결국은 최종당화산물의 형성을 가속화시킨다.
- [0010] 이와 같이 비효소적 당화반응, 폴리올 경로 및 산화적 스트레스(oxidative stress) 작용 기전들이 서로 연관되어 당뇨병병증을 유발시킨다. 따라서, 모든 당뇨병병증의 발병을 지연시키거나 예방 또는 치료하기 위해서는 최종당화산물의 형성을 억제하는 것이 매우 중요함이 밝혀졌다(Brownlee, M., et al., 1988, *N. Engl. Med.*, 318, 1315-1321).
- [0011] 현재, 단백질 당화 억제제로서 합성제제인 아미노구아니딘(aminoguanidine)은 친핵성 히드라진(hydrazine)으로 아마도리 산물과 결합하여 단백질과의 교차결합을 방지함으로써 최종당화산물의 생성을 억제하여 합병증으로 진행되는 것을 지연 또는 방지한다(Brownlee, M., et al., 1986, *Sciences*, 232, 1629-1632; Edelstein, D. et al., 1992, *Diabetes*, 41, 26-29). 아미노구아니딘은 당뇨병병증의 예방 및 치료에 가장 유망한 합성 의약품으

로 제3상 임상실험까지 진행되었으나, 장기간 투여 시 독성이 유발되는 문제점이 나타나 중단되었다. 그러므로, 안전하고 효능이 우수한 천연약제의 개발이 요망되고 있는 실정이다.

[0012] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 천연 약재를 이용한 당뇨합병증 치료제를 개발하던 중 식나무 추출물 또는 이의 분획물이 최종당화산물의 생성을 억제함으로써, 당뇨합병증의 지연, 예방 또는 치료 효능이 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 당뇨합병증 유발 원인 중의 하나인 최종당화산물의 생성을 억제하는 효능이 있는 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함함으로써 수정체 섬유유 변성, 망막과 신장에서의 병적 이상, 족부궤양, 신경병증, 혈관질환 등의 당뇨합병증 발병을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 당뇨합병증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 식나무(*Aucuba japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "식나무(*Aucuba japonica*)"는 층층나무과(Cornaceae)에 속하는 상록의 활엽관목으로서 키는 3m 정도이다. 3~4월에 자갈색의 꽃이 피고 열매는 10월경에 붉은색으로 익는다. 주로 따뜻한 산지에서 정원수로 자라며, 온대 조엽수림을 이루는 대표적인 종류로서 한국 남부에 분포하고 있다. 상기 식나무는 항염증, 간손상 보호 및 염모제 효능이 보고되어 있으나, 항당뇨, 항당뇨합병증 및 혈당 강하 등의 약리작용에 대하여는 보고된바 없다.

[0017] 본 발명의 식나무는 재배한 것, 시판되는 것 등 다양한 방법으로 입수한 것을 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물"은, 식나무의 추출 처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다. 본 발명의 상기 추출물 또는 분획물은 바람직하게는 추출 후 건조 분말 형태로 제조되어 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 상기 식나무 추출물은, 상기 식나무의 천연, 잡종 또는 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 식나무의 가지, 잎, 뿌리, 꽃 및 열매뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터도 추출이 가능하다.

[0020] 본 발명의 상기 식나무 추출물은 바람직하게는 식나무의 가지, 잎 또는 이의 혼합물의 추출물일 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 식나무 추출물은 하기와 같은 방법으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 식나무에 추출 용매를 가하여 추출하는 단계;

[0023] 상기 추출 단계에서 수득한 추출물을 식힌 후 여과하는 단계; 및

[0024] 상기 여과 단계에서 여과한 추출물을 감압 농축하고 건조하는 단계.

[0025] 본 발명의 상기 식나무 추출물에 있어서, 상기 식나무를 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 상기 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수

추출법, 초음파 추출법, 여과법, 환류 추출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 식나무를 추출하는 데에 사용되는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 또는 이들의 혼합 용매 등을 들 수 있으며, 알코올을 용매로 사용하는 경우에는 바람직하게는 C₁ 내지 C₄의 알코올, 보다 바람직하게는 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올, 더욱 바람직하게는 80% 에탄올 수용액을 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 식나무 추출물은 바람직하게는 물 또는 에탄올 추출물일 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 식나무를 열수 추출 방법으로 추출하는 경우에는, 1회 내지 5회 반복 추출하는 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 추출 용매는 건조된 식나무의 중량 대비 0.1배 내지 10배 첨가할 수 있으며, 0.3배 내지 5배 첨가하는 것이 바람직하다. 추출 온도는 20℃ 내지 70℃인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출 시간은 12시간 내지 48시간인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0028] 본 발명의 상기 식나무 추출물을 제조하는 방법에 있어서, 상기 감압 농축은 진공 감압 농축기 또는 진공 회전 증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압 건조, 진공 건조, 비등 건조, 분무 건조 또는 동결 건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0029] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 식나무의 가지 또는 잎을 물로 세척하고 그늘에서 건조한 다음, 상기 건조된 식나무 가지 또는 잎을 분쇄하여 추출 용기에 투입 후, 추출 용매로 상온에서 반복 추출하여 추출물을 수득하였다. 상기 수득한 식나무 추출물을 거름종이 등을 이용하여 고형분을 제거하고 여과한 다음, 상기 추출액을 감압 농축하여 식나무 추출물을 제조하였다.

[0030] 본 발명에서 사용되는 용어 "분획물"은, 여러 다양한 구성 성분들을 포함하는 혼합물로부터 특정 성분 또는 특정 성분 그룹을 분리하기 위하여 분획을 수행하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0031] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 분획 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 수행될 수 있다. 상기 분획 방법의 비제한적인 예로는, 식나무를 추출하여 얻은 추출물에 소정의 용매를 처리하여 상기 추출물로부터 분획물을 얻는 방법을 들 수 있다.

[0032] 본 발명에서 상기 분획물을 얻는 데에 사용되는 분획 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 분획 용매의 비제한적인 예로는 물, 알코올 등의 극성 용매; 헥산, 에틸 아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성 용매 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합하여 사용될 수 있다. 상기 분획 용매 중 알코올을 사용하는 경우에는 바람직하게는 C₁ 내지 C₄의 알코올을 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 상기 식나무 추출물 또는 이의 분획물은 최종당화산물의 생성을 억제하는 효능을 나타내며, 이는 본 발명에서 최초로 규명된 것이다.

[0034] 구체적으로 본 발명의 식나무 추출물 또는 이의 분획물은 당뇨병증의 주요 원인 중 하나인, 최종당화산물의 생성을 억제하여 수정체 섬유질의 변성, 망막과 신장에서의 병적 이상, 족부궤양, 신경병증, 혈관질환 등의 당뇨병증 발병을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 나타낸다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 단백질원으로서 소혈청알부민을 사용하여 상기 소혈청알부민과 과당 또는 글루코스와의 결합 정도를 지표로 이용하여 식나무 추출물의 최종당화산물 생성 억제 효능을 평가한 결과, 대표적인 양성대조군인 아미노구아니딘보다 10배나 더 효능이 우수함을 확인할 수 있었다(실험예 1).

[0036] 또한, 본 발명의 상기 조성물은 당뇨병증의 예방, 개선 또는 치료 효과를 충분히 나타내는 농도 범위에서 세포 독성을 나타내지 않으며, 천연물로부터 유래된 것이어서 체내에 심각한 자극을 가한다거나 유해한 작용을 유발함이 없이 안정하게 사용될 수 있는 이점이 있다.

- [0037] 본 발명에서 사용되는 용어 "당뇨합병증"은, 당뇨병이 장기간 지속되는 경우 유발되는 증상을 의미한다. 당뇨합병증은, 당뇨병의 발병 기준 및 판단 기준과 상이하하며, 당뇨합병증 치료제는 당뇨병 치료제와는 별개로 사용되고 있다.
- [0038] 당뇨합병증 유병의 원인은 최종당화산물(advanced glycation endproducts, AGEs) 및, 알도즈 환원효소(aldose reductase)의 비정상적인 활성과 가속화된 산화성 스트레스에 의해 유발되므로, 당뇨합병증의 치료제로서의 개발 시 최종당화산물 및 알도즈 환원효소의 활성과 항산화 효능을 측정하여 치료제의 효능을 판단할 수 있다. 또한, 당뇨합병증으로 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 신증, 신경병증, 심장병 등이 야기되므로, 직접적으로 망막병, 백내장, 신증 및 신경병증 등을 억제하는 것으로 직접적인 치료제의 효능을 나타낸다.
- [0039] 본 발명에서, 당뇨합병증의 비제한적인 예로 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 족부궤양, 당뇨병 심장병, 암, 골다공증 등을 들 수 있다. 본 발명의 상기 당뇨합병증은 특별히 제한되지 아니하나, 본 발명의 목적상, 바람직하게는 당뇨병 망막병증, 당뇨병 백내장, 당뇨병 신증, 당뇨병 신경병증, 족부궤양 또는 당뇨병 심장병을 의미할 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명의 상기 조성물을 개체에 투여하여 당뇨합병증의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 개체에 투여하여 당뇨합병증의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0043] 본 발명의 상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 식나무 추출물 또는 이의 분획물은 상기 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 바람직하게는 1 중량% 내지 99.99 중량%로 함유될 수 있고, 보다 바람직하게는 10 중량% 내지 99.99 중량%로 함유될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 50 중량% 내지 99.99 중량%로 함유될 수 있다. 상기 범위 내에서, 상기 식나무 추출물 또는 이의 분획물에 따른 최종당화산물의 형성 억제 효과를 비롯한 당뇨합병증 치료 효과가 충분히 발휘되어 본 발명의 목적을 달성하기에 보다 적합해지는 이점이 있다.
- [0044] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 상기 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 함유하는 것에 더하여, 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서, 상기 "약학적으로 허용 가능"하다는 것은, 이를 투여 시 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는, 약학 분야에서 통상적으로 사용되는 것을 의미한다.
- [0046] 본 발명의 상기 약학적 조성물은, 상기 담체와 함께 제제화되어, 식품, 의약품, 사료 첨가제, 음용수 첨가제 등으로 활용될 수 있다.
- [0047] 본 발명에서, 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 텍스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제 들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용

될 수 있다.

- [0050] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.
- [0051] 본 발명의 상기 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산 마그네슘(Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘(Calcium stearate), 스테아릴 푸마르산 나트륨(Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스(Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다.
- [0052] 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.
- [0053] 상기 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.
- [0054] 본 발명의 상기 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0055] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 상기 약학적 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의학 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 보다 바람직한 효과를 위한 투여량은, 바람직하게는 1일 1 mg/kg 내지 1,000 mg/kg, 보다 바람직하게는 10 mg/kg 내지 500 mg/kg일 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여는 하루에 1 회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.
- [0060] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 아니한다.
- [0061] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 바람직하게는 경구 투여 또는 주사 투여될 수 있다.
- [0062] 또한, 본 발명은 식나무(*Aucuba japonica*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨합병증 예방

또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하여 당뇨병병증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

- [0063] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"는 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유 동물을 비롯한 모든 동물을 의미한다.
- [0064] 본 발명의 상기 당뇨병병증의 예방 또는 치료 방법에서, 상기 약학적 조성물에 관한 설명, 및 상기 약학적 조성물의 투여량, 투여 경로, 투여 방식에 관한 설명, 당뇨병병증의 종류, 예방 및 치료의 의미 등은 본 발명의 상기 약학적 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0065] 또한, 본 발명은 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 당뇨병병증 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0066] 본 발명의 상기 식품 조성물에서, 상기 식나무 추출물 또는 이의 분획물, 및 이의 효능 등은 본 발명의 상기 약학적 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 동일하다.
- [0067] 본 발명의 상기 식품 조성물은 특별히 제한되지 아니하며, 건강 기능 식품 조성물을 포함한다.
- [0068] 본 발명의 상기 건강 기능 식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0069] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0070] 본 발명의 상기 건강 기능 식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비제한적인 예로 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 들 수 있다. 상기 첨가되는 추가 성분의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0071] 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 음료 또는 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 사용되거나 2 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가물의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0072] 본 발명의 식나무 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 조성물은 당뇨병병증 유발 원인 중의 하나인 최종당화산물의 생성을 억제하는 효능이 있어 수정체 섬유의 변성, 망막과 신장에서의 병적 이상, 족부궤양, 신경병증, 혈관질환 등의 당뇨병병증에 매우 효과적이므로 당뇨병병증의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물로서 유용하게 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 식나무 추출물 또는 이의 분획물은 독성이 없고 천연물로부터 유래된 물질이어서 인체에 적용하여도 부작용없이 활용할 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0073] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 식나무 가지 추출물의 제브라피쉬에서의 혈관두께 변화를 보여주는 형광이미지를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 식나무 가지 추출물의 제브라피쉬에서의 혈관두께 변화를 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 식나무 가지 추출물의 제브라피쉬에서의 혈관두께 변화의 억제율을 그래프

로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[0075] **실시예 1: 식나무 추출물 제조**

[0076] 실험에 사용된 식나무 가지 및 잎이며 증거표본은 한국한의학연구원 한의융합연구본부, 당뇨합병증연구센터 표본실에 보관중이다.

[0077] 1) 추출단계

[0078] 음건 및 세절한 식나무의 가지 및 잎을 분쇄한 후, 1.0 L 80% 에탄올을 넣고, 추출용기에서 상온상태로 48 시간 동안 3 시간 반복 추출한 후, 40℃에서 감압 하에 농축시켜 에탄올 추출물을 얻었다.

[0079] 2) 농축 및 건조단계

[0080] 상기 추출액을 여과한 후 감압 상태에서 농축하였다. 이때, 구성성분의 분해 및 가수분해를 방지할 수 있도록 농축시 온도를 40℃ 내지 45℃로 유지하였다.

[0081] **실험예 1: 최종당화산물 생성 억제 효능(In-vitro) 분석**

[0082] 식나무 가지 추출물에 대하여 시험관 내에서 최종당화산물 생성 억제 효능을 분석하였다.

[0083] 단백질은 소혈청알부민(bovine serum albumin BSA, Sigma, USA)을 이용하여 과당 및 글루코스와의 결합 정도를 지표로 이용하고, 최종당화산물 생성 억제에 우수한 효능을 갖는 아미노구아니딘(aminoguanidine: AG)을 양성대조군으로 사용하였다.

[0084] 단백질원인 소혈청알부민(BSA)을 10 mg/ml의 농도로 50 mM 인산완충용액(phosphate buffer; pH 7.4)에 혼합하여 제조하였다. 당원은 0.2 M 과당과 0.2 M 글루코스의 혼합액을 사용하였다. 상기 식나무 가지 추출물(25 µg/ml, 50 µg/ml 및 70 µg/ml) 및 양성대조군인 아미노구아니딘(55.505 µg/ml, 74.75 µg/ml 및 92.5 µg/ml)을 다양한 농도로 DMSO에 녹인 후 15% tween 80을 첨가하였다. 이때 총 DMSO의 함량은 0.2%이었다. 이를 상기 소혈청알부민과 당의 혼합액에 첨가하고 37℃에서 7일 동안 배양하였다. 이때, 0.02% 소듐아자이드(sodium azide)를 항박테리아제로서 첨가하였다. 소혈청알부민과 당 혼합액을 대조군으로 사용하였다. 각 시험군과 대조군의 공시험군(blank)은 각각 조제한 후 배양하지 않았으며, 모든 배양액은 3개씩 준비하여 최대한 오차를 피하였다. 배양 7일 후, 각각의 배양액에서 생성된 최종당화산물의 함량을 분석하였다. 최종당화산물의 양을 마이크로플레이트 리더(Microplate reader, Excitation; 350 nm, Emission; 450 nm)로 측정하여 생성 억제효능을 하기 수학적 1로 계산하였다. 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0085] [수학적 1]

[0086]
$$\text{생성억제율(\%)} = \left\{ 100 - \frac{(\text{시료군의 형광강도}) - (\text{시료공시험군의 형광강도})}{(\text{대조군의 형광강도}) - (\text{대조군공시험군의 형광강도})} \right\} \times 100$$

표 1

[0087]

	Conc. (µg/ml)	Inhibition (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
	7days	7 days	7 days

식나무 가지 추출물	2.5	10.51±0.55	7.88±0.16
	5	37.46±1.31	
	10	62.37±1.43	
아미노구아니딘	55.5	41.71±0.17	81.03±0.70
	74	49.97±0.35	
	92.5	60.86±0.68	

[0088] 상기 표 1을 통해 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 식나무 추출물의 최종당화산물 생성억제효능의 IC₅₀값이 7.88 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 확인되었다. 이는 대표적인 양성대조군인 합성 단일화합물인 아미노구아니딘(IC₅₀ 값: 81.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$)보다 10 배 효능이 월등히 우수함이 증명되었다.

[0089] 즉, 식나무 추출물의 경우 단백질과 당의 결합을 억제하여 최종당화산물의 생성을 강력하게 저해하므로 당뇨합병증으로 진행되는 것을 강하게 예방 또는 치료할 수 있음이 확인되었다.

[0090] **실험예 2: 제브라피쉬 발생배를 이용한 당뇨병성 망막증에 대한 효능(In-vivo) 분석**

[0091] 제브라피쉬(Zebrafish)는 척추동물 중에 속하며 in vivo screening 검색 시스템 중의 하나이다. 이하에서, 제브라피쉬를 이용하여 식나무 추출물의 in vivo 시스템에서 항당뇨합병증 효능을 측정하였다.

[0092] 1) 실험방법

[0093] ① 제브라피쉬 발생배 준비

[0094] 혈관내피세포에 특이적으로 형광단백질(green fluorescence protein)이 발현하는 형질전환 제브라피쉬(Tg(kdr:EGFP)) 암수를 교배하여 발생배(embryo)를 획득하였다.

[0095] ② 고혈당 유도 및 약물처리

[0096] 수정 후 72 시간째 형광을 발현하는 발생배를 선별하여 24 well plate에 5 개체씩 분주한 후 130 mM glucose를 이용하여 고혈당을 유도하였다. 이때 확인하고자 하는 약물(식나무 가지 추출물)을 130 mM glucose 용액에 같이 희석하여 처리하였다. 약물 처리 후 3일 동안 고혈당 환경에서 사육한 후, 3일째 되는 날 눈 혈관 변화를 분석하였다.

[0097] ③ 유리체 혈관 변화 분석

[0098] 고혈당 조건에서 3일간 처리한 후, 4% paraformaldehyde를 이용하여 하루 동안 고정하였다. 고정된 개체를 3차 증류수로 15분 간격으로 3번 이상 수세하고, 3% trypsin [Tris-HCl (pH 7.8)]을 이용하여 80 분간 37°C에서 반응시킨 후, 수정체를 분리하였다.

[0099] ④ 통계분석

[0100] Olympus SZX16 stereomicroscope을 이용해 유리체 혈관의 이미지를 얻은 후 Image J로 optic disc를 중심으로 약 30마이크로미터에 위치에 있는 혈관의 두께를 측정하고, GraphPad Prizm 5 software (GraphPad, San Diego, CA, USA)로 분석하였다.

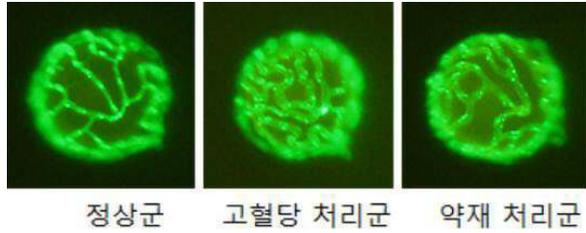
[0101] 2) 실험결과

[0102] 식나무 가지 추출물을 처리한 결과를 도 1 내지 도 3에 나타내었다. 도 1 내지 도 3에 나타난 바와 같이, 정상군(9.75AU)에 비해 30 mM glucose 용액에서 5일간 배양한 고혈당군(HG)의 유리체 혈관의 직경이 유의적으로 확장되었다(12.77 AU, ###P<0.001 vs. 정상군). 고혈당 환경에서 식나무 가지 추출물 처리군(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 고

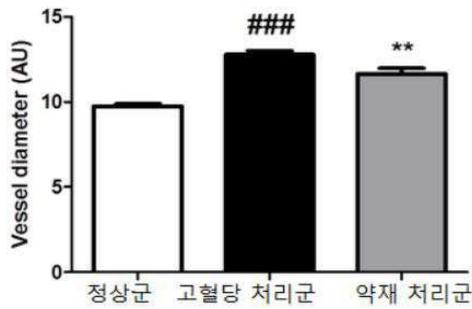
혈당에 의한 눈 혈관 확장이 유의적으로 감소함을 확인할 수 있었다(11.66AU; **P<0.01 vs. 고혈당 처리군). 이로써 당뇨 눈합병증의 예방 및 치료 효능이 우수함을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

